

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

Направление «Физика»



## Перенос энергии в комплексах серебро-ДНК

Бакалаврская диссертация студента

\_\_\_\_\_ **Лысенко Романа Александровича**

Научный руководитель:

\_\_\_\_\_ к. ф.-м. н., доц. **Кононов А.И.**

Рецензент:

\_\_\_\_\_ к. ф.-м. н., ст. науч. сотр., **Мельников А.С.**

Санкт-Петербург

2017

## Оглавление

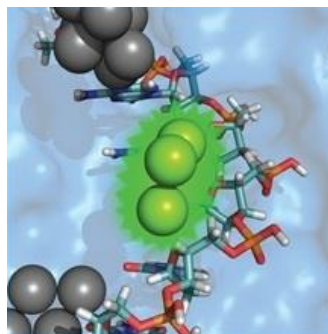
Введение .....	3
Литературный обзор .....	4
Используемые материалы и методы исследования .....	16
<i>Используемые реактивы и синтез кластеров</i> .....	16
<i>Методы исследования</i> .....	17
Результаты и обсуждение .....	19
<i>Получение спектров возбуждения и испускания статической люминесценции</i> .....	19
<i>Измерение времени жизни люминесценции кластеров в наносекундном диапазоне</i> .....	22
<i>Измерение времени жизни люминесценции кластеров в пикосекундном диапазоне</i> .....	24
Заключение .....	33
Благодарности .....	34
Список литературы .....	35

## **Введение**

Исследование свойств кластеров металлов является актуальной темой в современной науке. Из-за своих небольших размеров (порядка десяти атомов), кластеры металлов представляют особый класс нанообъектов. Вследствие данного факта, в электронные свойства кластеров существенный вклад вносят квантово-размерные эффекты, из-за чего их электронно-энергетическая структура становится схожа с молекулярной. Из-за своей хорошей люминесценции, главный интерес представляют кластеры благородных металлов: золота и серебра, а также кластеры меди. Кластеры серебра отличаются высокой яркостью люминесценции, а также фотостабильностью. Благодаря хорошей биосовместимости и возможности внедрения в клетку, кластеры серебра, стабилизированные биополимерной матрицей, могут применяться в качестве молекулярных сенсоров, зондов для биоимиджинга и в качестве систем, устойчивых к ультрафиолетовому излучению. Несмотря на множество публикаций, посвященных исследованию люминесцирующих металлических кластеров, остаются невыясненными многие как практические, так и теоретические вопросы. Например, до сих пор отсутствуют оптимальные протоколы синтеза того или иного кластера. Также остаются до конца не выясненными фотопроцессы, возникающие при возбуждении светом системы матрица-кластер. Данная работа, представляет собой ряд экспериментов, целью которых было получение ответов лишь на несколько вопросов из огромного множества вопросов в данной сфере научной деятельности.

## Литературный обзор

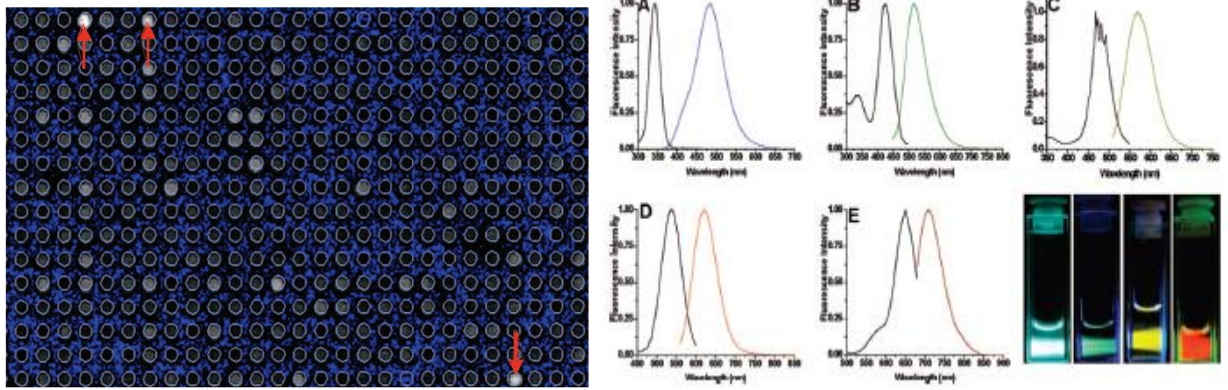
В настоящее время наночастицы и нанокластеры металлов применяются во многих сферах научной деятельности, таких как: химия, медицина, биология и др. [1].



**Рис. 1. Оптимизированная структура комплекса ДНК-кластер серебра. [5]**

Наиболее часто для создания кластеров используются такие благородные металлы как: золото, серебро и платина, также часто используется медь. В частности, было замечено высокое взаимодействие ионов серебра с основанием цитозина на одноцепочечной ДНК, что делает ДНК-олигонуклеотиды хорошей матрицей для синтеза кластеров. Первая работа в которой были получены кластеры серебра на ДНК была произведена Диксоном и его коллегами в 2004 году [2]. Для этого авторы использовали нитрат серебра, борогидрид натрия (как восстановитель) и одноцепочечный нуклеотид -AGGTCGCCGCC-последовательности. На основании данных со спектров поглощения и кругового дихроизма была высказана версия о связи образовавшихся кластеров не с фосфатами, а азотистыми основаниями: с азотом в пуринах при концентрации  $<0,2$  Ag/основание и с пиримидинами при концентрации около  $0,5$  Ag/основание.

После выхода данной статьи, количество статей, посвященных теме, быстро росло. Стали проводиться работы по подбору таких последовательностей ДНК, которые бы образовывали системы ДНК-серебро с наибольшей флуоресценцией. Был разработан микрочип для высокопроизводительного отбора ДНК-олигонуклеотидов [3].

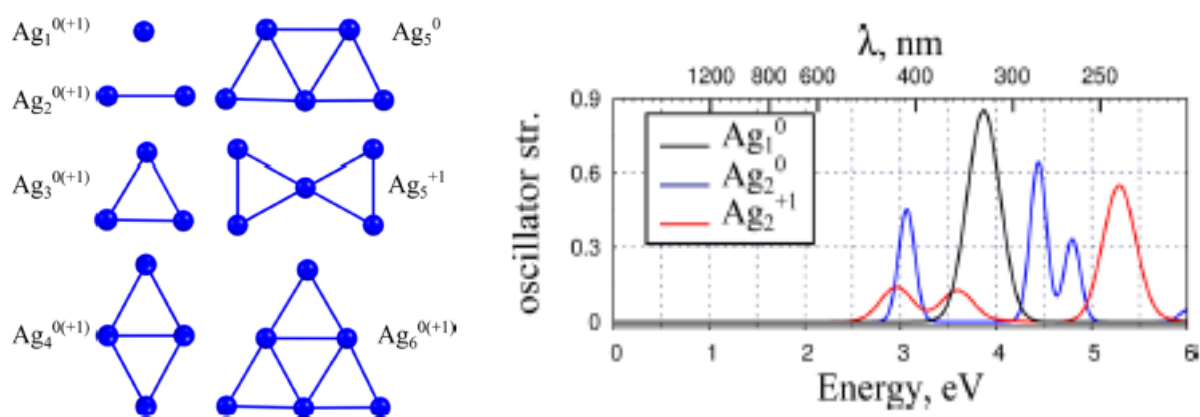


**Рис 2. Выделение из микрочипа ДНК, возбужденного на длине волны 543нм и системы ДНК-серебро, излучающие на длинах волн соответствующих синему, зеленому, желтому, красному и близкому к инфракрасному излучению. [3]**

В результате, было выделено пять наиболее интенсивно флуоресцирующих систем. (рис. 2)

В 2007 году Диксон и соавторы опубликовали работу по исследованию флуоресцентного кластера серебра, связанного с протеином и названного нуклеолин [4]. Инкубация кластеров происходила в клетках, в связи с чем нуклеолин мог использоваться для окрашивания клеток. Для создания кластеров в пробирке, авторы разработали короткие пептиды, включающие в себя специфичные аминокислоты, которые взаимодействуют с кластером в нуклеолине. Было показано, что этот способ подходит для окрашивания клеток.

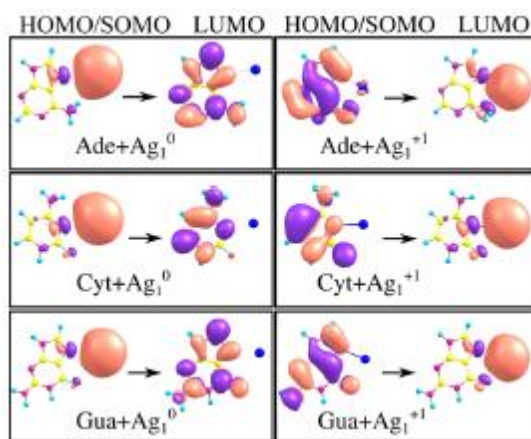
По мере развития, появляются теоретические работы, посвященные взаимодействию ДНК с кластерами серебра. В одной из таких работ была выполнена оптимизация геометрии и расчет спектров возбуждения с помощью метода DFT (density functional theory) – метода расчёта электронной структуры систем из многих частиц [5]. Полученные расчеты хорошо согласовались с экспериментальными и с расчетами, полученными другими группами исследователей.



**Рис. 3. Оптимизированные структуры заряженных и нейтральных кластеров серебра и спектры возбуждения для различных нитевидных кластеров. [5]**

Авторы проводили различия между группами кластеров с нитевидной формой, где каждый атом серебра в кластере связан лишь с одним или двумя другими атомами и плоской формой кластеров. Было отмечено главное их отличие в способности к самоформированию в свободных условиях. Формация удлиненных форм кластеров обязательно включает несколько сайтов связывания на полимер в отличие от плоских форм. В такой модели позиционирования сайтов связывания на полимерной цепи и определялись параметры геометрии и спектры поглощения нитевидных кластеров. Также были проведены расчеты для систем ДНК-серебро. В качестве шаблона была взята одноцепочечная ДНК, составленная из гуанина, цитозина и аденина.

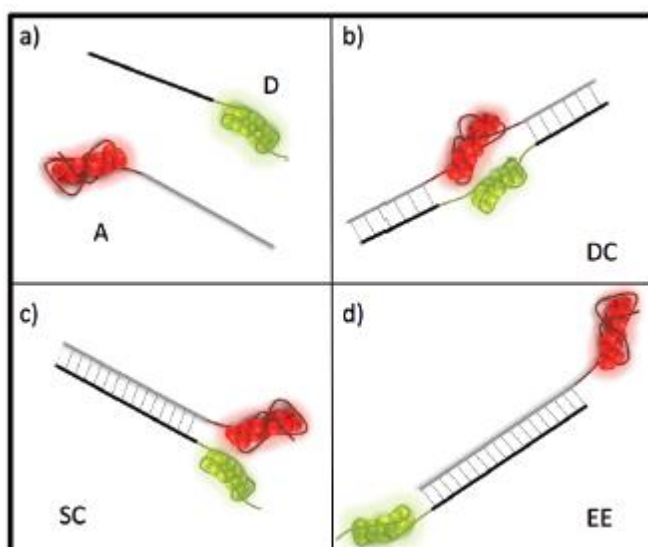
Как более вероятные сайты связывания оснований с кластерами, были отмечены третий атом азота в пиримидиновом кольце и первый атом азота в пуриновом кольце. В данной работе было выделено несколько моделей такого связывания. В одной из моделей рассматривались комплексы плоских кластеров, связанных с атомом N3 цитозина и атомами N7 гуанина и аденина. Рассматривались энергетические переходы между самыми низкими энергетическими уровнями (LUMO) и самыми высокими энергетическими уровнями (HOMO) или с уровнями с одноквантованными молекулярными орбиталями (SOMO).



**Рис. 4. Иллюстрация НОМО (SOMO) и LUMO состояний для нейтрального и заряженного серебра связанного с ДНК основанием. [5]**

В целом, это исследование показало, что плоские кластеры Ag, связанные с основаниями ДНК посредством связи с атомами азота, обладают самым низким поглощением энергии и, следовательно, низкой излучательной способностью. Спектры их поглощения не соответствуют спектрам возбуждения излучающих кластеров. В то же время, нитевидные структуры серебра имеют спектры возбуждения, схожи с наблюдаемыми спектрами флуоресцентных полимер-стабилизированных кластеров Ag. Кроме того, оказалось, что очень небольшой изгиб в цепи серебра вызывает сильный сдвиг полосы поглощения. Таким образом, нитевидные структуры серебра, содержащие очень мало атомов, стабилизируемых полимерной цепью, могут обеспечить большое разнообразие видов излучения. Такое разнообразие может быть обеспечено незначительным изменением локальной полимерной структуры, которая зависит от последовательности оснований (в случае с ДНК). Кластеры, содержащие только три атома Ag могут покрывать весь видимый диапазон. Были показаны примеры стабилизированных ДНК структур нитевидного кластера, содержащего три атома серебра.

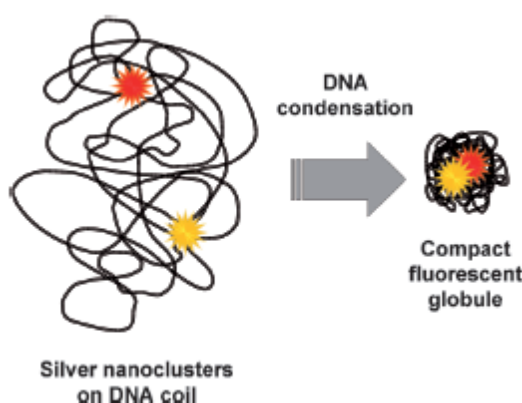
В 2013 году вышла статья о способе закрепления флуоресцентных кластеров серебра состоящих из 10-20 атомов серебра, сохраняя при этом индивидуальную структуру каждого кластера [6]. Это осуществлялось с использованием сборных узлов ДНК, которые включали кластер с 10 атомами серебра и кластер с 15 или 16 атомами серебра. А так называемый термомодулированный флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) проверял собранную систему на целостность.



**Рис 5. Четыре модели двойных кластерных сборок на ДНК. [6]**

Таким образом, исследователи проверяли различные способы слияния кластеров двух типов в различные конструкции. Идентифицировать ту или иную конструкцию удавалось с помощью метода FRET и гель-электрофореза.

Помимо исследования клубковых конформаций систем ДНК-кластер, опубликовывались работы где исследовалась конденсация этой системы. В одной из таких работ, в систему DNA-Ag добавлялся полиаллиламин в качестве конденсирующего агента [7]. Оказалось, что конденсированные системы более защищены от разного рода разрушительных влияний (например, окисление), чем системы линейных полимеров. Кроме того, срок хранения этих частиц увеличивается.



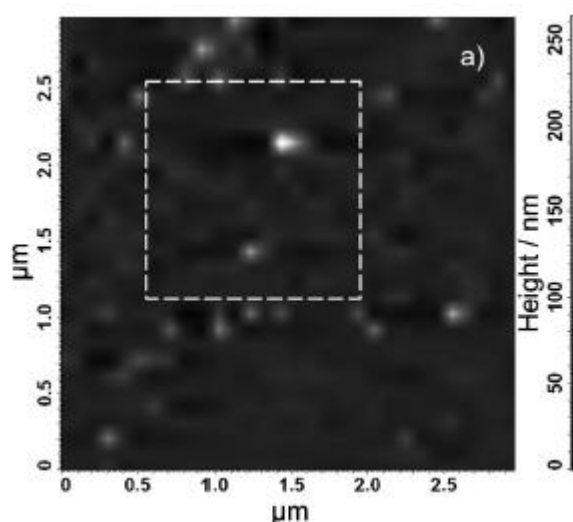
**Рис. 6. Переход системы ДНК-кластер из клубка в глобулу. [7]**

Флуоресцентные кластеры на двухцепочечной, так и на одноцепочечной ДНК показали схожие полосы излучения, что означает единственность связывательного сайта. С использованием теории функциональной плотности,



было показано, что кластеры могут связываться с Уотсон-Криковской парой гуанин-цитозин и с основаниями одноцепочечной ДНК примерно с одинаковой афинностью.

Также, были получены STM изображения отдельных конденсированных частиц на графитовой подложке. Были определены размеры этих частиц равные примерно 100нм.

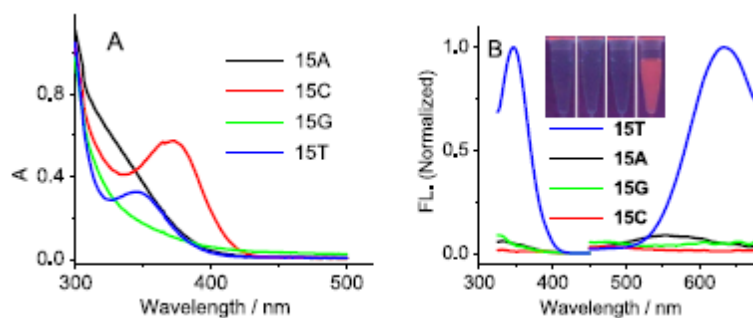


**Рис. 7. STM изображение сконденсированной системы ДНК-кластер на графитовой подложке. [7]**

В целом, это исследование показало принципиальную возможность “упаковывать” флуоресцентные кластеры, используя ДНК, специфичность связывания кластеров серебра с ДНК, а также возможности по созданию 2D и 3D проводниковых Ag сетей на различных структурах ДНК.

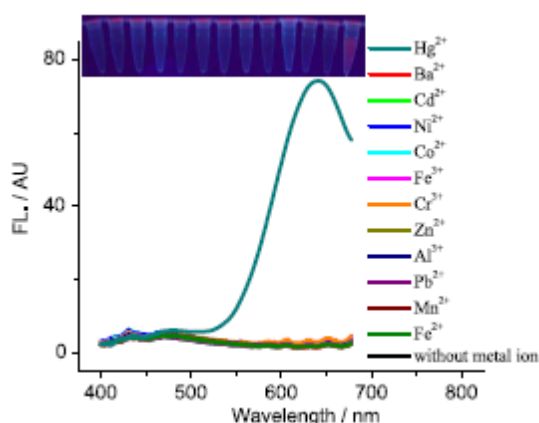
Помимо исследований AgNCs, проводились исследования AuNCs. Известна слабая связь между отрицательно заряженной ДНК и Au. Для стабилизации кластеров золота в слабом водном растворе используется диметиламинборан в качестве восстановителя [8].

Изучалась зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации того или иного нуклеотида в ДНК [9]. Исследователи синтезировали кластеры меди на одноцепочечном гомоолигонуклеотиде. Выяснилось, что наибольшие фотохарактеристики имеет гомоолигонуклеотид 15T.



**Рис 8. Спектры поглощения и флуоресценции для тиминовых, адениновых, гуаниновых и цитозиновых 15-ти мерных гомоолигонуклеотидов. [9]**

Также изучалось влияние присутствия ионов различных металлов на созревание и последующие фотохарактеристики гомоолигонуклеотида 21T с кластером меди.



**Рис 9. Спектры испускания системы ДНК-кластер меди в присутствии ионов различных металлов. [9]**

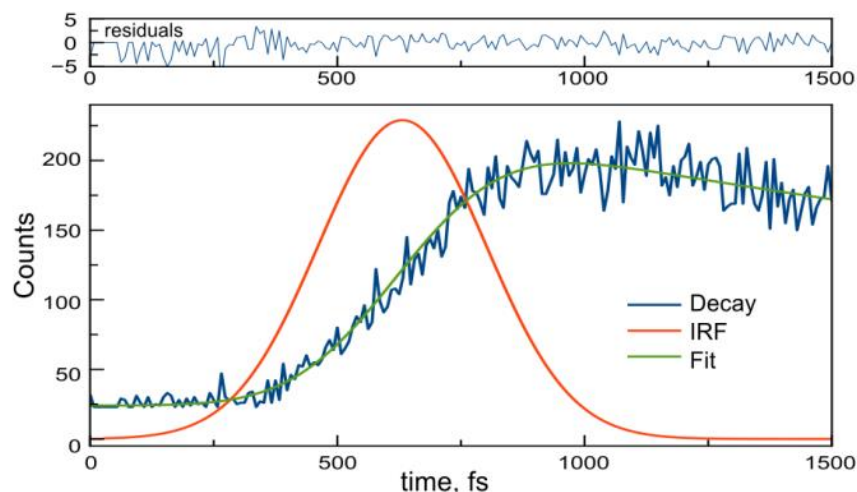
Было установлено, что в присутствии иона ртути  $Hg^{2+}$  система лучше всего проявляет себя. Исходя из данного факта, авторами было предложено практическое приложение таких люминесцирующих систем. А именно, проверять воду на наличие ртути добавлением 21T-CuNCs.

Также достаточно много работ посвящено исследованию кластеров меди. CuNCs чаще всего образуются связью с двухцепочечной ДНК и формируются путем восстановления  $Cu^{2+}$  аскорбатом при низкой концентрации  $CuSO_4$ . Причем, было замечено, что размер кластеров был пропорционален числу оснований двухцепочечной ДНК. Первоначально с одноцепочечными ДНК связи вообще не образовывались. Этот факт было предложено использовать в биотехнологических и медицинских целях [10]. Однако, несколько позже, удалось сформировать кластер с одноцепочечной ДНК [9].

В 2009 году проводились исследования над созданием систем золото-протеин. В итоге, был получен кластер золота на бычьем сывороточном альбумине (БСА) с хорошими флуоресцентными характеристиками. БСА-AuNC состоял из 25 атомов золота и давал интенсивное красное излучение на 640 нм при возбуждении при 480 нм. Было высказано предположение, что такой результат обусловлен сочетанием связей Au-S с белком [11]. Также был опубликован ряд работ посвященных получению кластеров золота на трипсине и лизоциме. В одной из работ, посвященных пепсину, была проведена зависимость размеров образованных кластеров от pH среды [12]. Для создания кластеров меди и платины был предложен способ, в основе которого было использование куриного белка, а для в качестве восстановителя использовали N2H4. Преимуществом этого способа является дешевизна реагентов, а также отсутствие токсичных веществ [13].

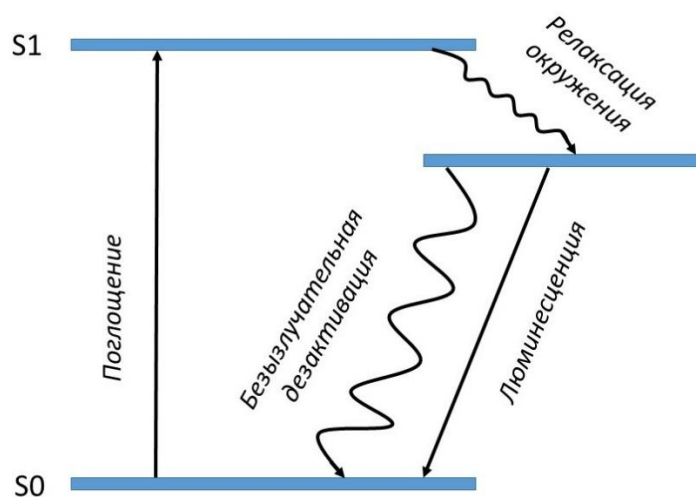
Нужно кратко упомянуть о дендримерах. Первые исследования CuNCs были проведены с PAMAM и PPI дендримерами, которые обладают легко узнаваемым ультрафиолетовым излучением. В 2002 году был получен первый стабильный водный раствор флуоресцентных кластеров серебра с дендримерной OH группой [14]. Также известно применение PAMAM дендримера для синтеза AuNCs [15]. При использовании тринатрийцитрата в качестве восстановителя, были получены PtNCs [16]. Известны работы по получению AuNCs с PPI дендримером, причем, размеры получившихся кластеров были около 2 нм [17].

Теперь стоит отметить тот факт, что большинство работ, посвященных люминесценции кластеров на ДНК были сделаны методом стационарной люминесцентной спектроскопии. Работ же, посвященных исследованию люминесценции с использованием метода временной люминесцентной спектроскопии очень мало на данный момент. Одной из таких работ является работа о переносе энергии между ДНК и кластером серебра [18]. В ней было показано, что перенос энергии электронного возбуждения в комплексе тимусной ДНК (ctDNA) с AgNCs происходит на фемптосекундной временной шкале.



**Рис. 10.** Возникновение флуоресценции связанного с ctDNA кластера серебра на длине волны 590нм. ( $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ нм}$ ). [18]

В общем случае, динамика системы, при возбуждении ее светом может быть представлена на схеме ниже (рис. 11).



**Рис. 11.** Трехуровневая схема фотопроцессов, возникающих в флуофоре, при облучении его светом.

Как видно из схемы, при поглощении света, система переходит из основного состояния  $S_0$  в возбужденное состояние  $S_1$ . Возвращение же обратно к состоянию  $S_0$  происходит не напрямую, а через промежуточное возбужденное состояние. При переходе из состояния  $S_1$  в промежуточное возбужденное состояние происходит релаксация растворителя – часть энергии поглощения расходуется. Из-за этого последующее далее испускание люминесценции происходит на больших длинах волн, чем те, которые соответствующих поглощению. Такая потеря энергии между поглощением и испусканием – или

стоксов сдвиг, может быть результатом нескольких динамических процессов. К таким процессам могут относиться:

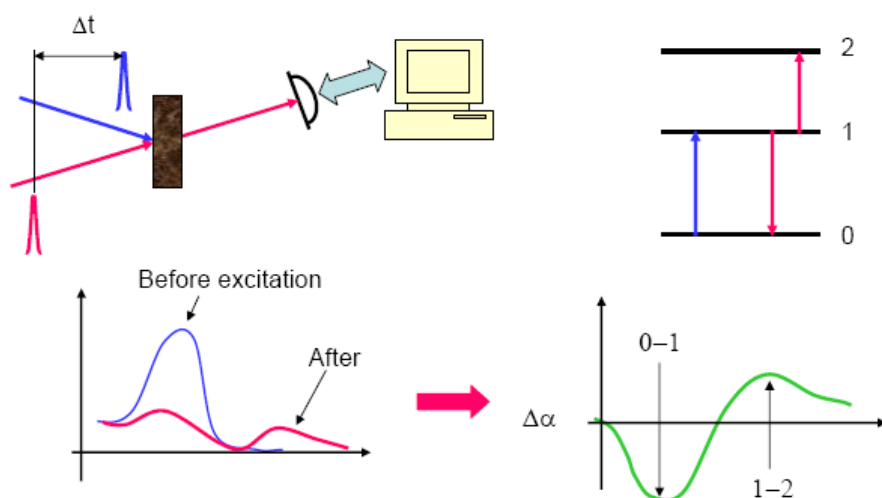
- процессы потери энергии вследствие диссипации колебательной энергии
- процессы перераспределения электронов в молекулах растворителя окружающих флуофор, вызванные изменением дипольного момента флуофора при возбуждении
- процессы переориентации растворителя около возбужденного диполя флуофора
- специфические взаимодействия (образование водородных связей или образование комплексов, переносящих заряд)

Обобщенно говоря, процесс перехода из состояния  $S_1$  в промежуточное возбужденное состояние обусловлен взаимодействием флуофора и растворителя.

При переходе из промежуточного возбужденного состояния в состояние  $S_0$ , помимо люминесценции может происходить процесс безызлучательной дезактивации, связанный с процессами в темновых кластерах. Одной из работ, в которой, затрагивалась тема изучения темновых кластеров, была статья Роберта Диксона [19]. В своей работе авторы использовали нанодоты - малоатомные кластеры серебра, инкапсулированные в одноцепочечную ДНК, т.к. по утверждению авторов, именно малоатомные кластеры демонстрировали дискретные излучательные свойства. Возбуждая высокоинтенсивным лазером фемтосекундной длительности, исследователи наблюдали за динамикой электронно-возбужденных состояний (ЭВС) серебряных нанодотов. Было показано, что она соответствует спектрально наблюдаемому переходному темному состоянию.

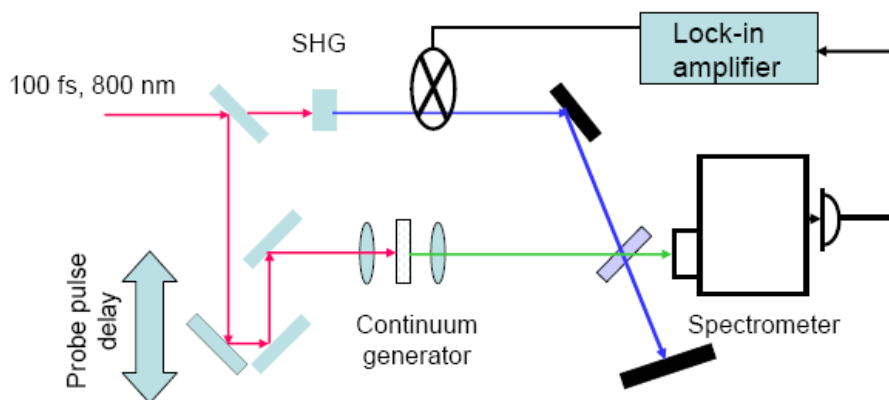
Стоит остановиться на методе, который использовался для получения спектров переходного поглощения – метод накачка-зонд (pump-probe method). Данный метод является наиболее универсальным методом для получения временных спектров. В наиболее простом варианте, возбуждающий лазерный луч разделяется на два луча. Образец облучается последовательностью импульсов одного луча – накачивается. Другой луч идет на регулируемую линию задержки и приходит на образец, через определенное время после первого луча, когда возбуждение образца первым лучом произошло и начались процессы

энергетических переходов. Таким образом, второй луч называется зондирующим, т.к. позволяет проследить изменения, произошедшие в образце после облучения его первым лучом (рис. 12). [20]



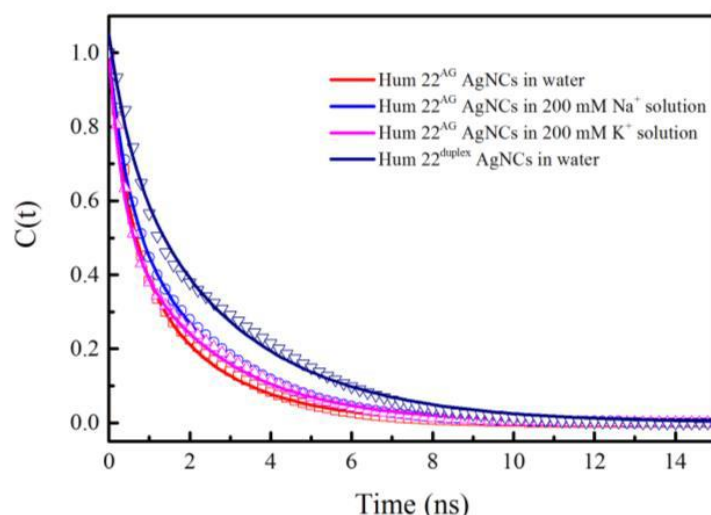
**Рис. 12.** Динамика спектров поглощения в трехуровневой молекулярной системе. [20]

Разрешение метода по времени определяется шириной импульса лазера и случайным рассогласованием времени задержки. Принципиальная схема установки показана на рис. 13.



**Рис. 13.** Схема “pump-probe” спектрометра. [20]

В еще одной статье посвященной исследованию свойств кластеров методом временной спектроскопии исследовался кластер серебра на 22-ти нуклеотидной цепочки теломерной ДНК человека [21]. Для оценки динамики релаксации была получена функция спектрального отклика  $S(t)$ .



**Рис. 14. Функция спектрального отклика  $C(t)$  кластера серебра при разных конформациях ДНК. [21]**

Исследования показали, что спектральная релаксация AgNCs вызвана несколькими факторами, такими как наличие нескольких видов испускания, конформационных движений оснований ДНК и динамика сольватации.

*В рамках данной работы ставилась задача изучения динамики электронно-возбужденных состояний для системы Green2, состоящей из кластера серебра и 15-мерного олигонуклеотида, которая включала в себя следующие подзадачи:*

- 1) Изучение кинетики люминесценции при возбуждении системы в области поглощения кластера.*
- 2) Изучение динамики переноса энергии путем возбуждения системы Green2 в области поглощения ДНК. (Не удалось выполнить в виду отсутствия в лазерной установке генерации третьей гармоники)*

## Используемые материалы и методы исследования

### Используемые реактивы и синтез кластеров

В данной работе использовался одноцепочечный олигонуклеотид Green2 последовательности: CGCCCCCCTCGGCGT фирмы «Beagle». Синтезированная ДНК находилась в дегидратированном виде, затем растворялась в воде до раствора с первоначальной концентрацией 100μМ. Также использовались реактивы NaBH<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>.

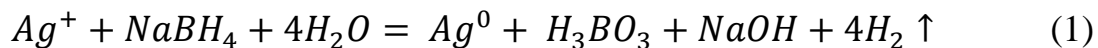
Был составлен протокол:

	Снач., μМ	Скон., μМ	V, μL	Вобщ., μL
DNA	100	25	250	1000
NaBH <sub>4</sub>	1000	75	75	
AgNO <sub>3</sub>	1000	150	150	
H <sub>2</sub> O	-	-	525	

Табл 1. Протокол приготовления системы кластер – ДНК.

Водный раствор нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>) концентрацией 150 μМ добавлялся к водному раствору ДНК концентрацией 25 μМ. Далее образец оставался при комнатной температуре на 15 минут. После, в образец добавлялся свежеприготовленный раствор борогидрида натрия, NaBH<sub>4</sub> концентрацией 75 μМ. Затем для получения монодисперсной среды, образец перемешивался на персональном вортексе (Vortex V-1 Plus, Biosan).

Реакция восстановления серебра при комнатной температуре описывается с уравнением [22]:



Затем после синтеза кластера, раствор подвергался суточной лиофильной сушке, которая осуществлялась в РЦ «Молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. В течение проведения экспериментов образец хранился в холодильнике при 4°C.



## Методы исследования

Для измерения времени жизни люминесценции в наносекундном диапазоне использовался флуориметр Fluorolog 3 (Ресурсный Центр СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества", [laser.spbu.ru](http://laser.spbu.ru)). Прибор включает в себя двойные монохроматоры на возбуждение и эмиссию, ксеноновую лампу в качестве источника излучения мощностью 450 Вт, импульсный светодиод с длиной волны 495 нм и длительность импульса - 1.1 нс, а также систему детектирования, работающую на основе технологии времякоррелированного счета единичных фотонов (TCSPC).

Для исследования фотопроцессов, происходящих в пикосекундном диапазоне, использовался титан-сапфировый 800 нм фемтосекундный лазер (Synergy 20), дающим на выходе импульсы с длительностью около 45 фемтосекунд с частотой следования 80 МГц и энергией порядка нДж.

Для измерения слабой люминесценции в установке используется метод ап-конверсии. Данный метод экспериментально реализуется следующим образом. Выходящий луч лазера делится на два луча – луч, проходящий через образец, возбуждающий люминесценцию образца и опорный луч, проходящий через линию задержки. Далее, с помощью высокоапертурного объектива два луча фокусируются в одну точку в нелинейном кристалле (для более точного совпадения лучей использовалась кювета с родамином, а потом нелинейный кристалл ставился обратно). Схема такой установки показана на рис. 15 [23].

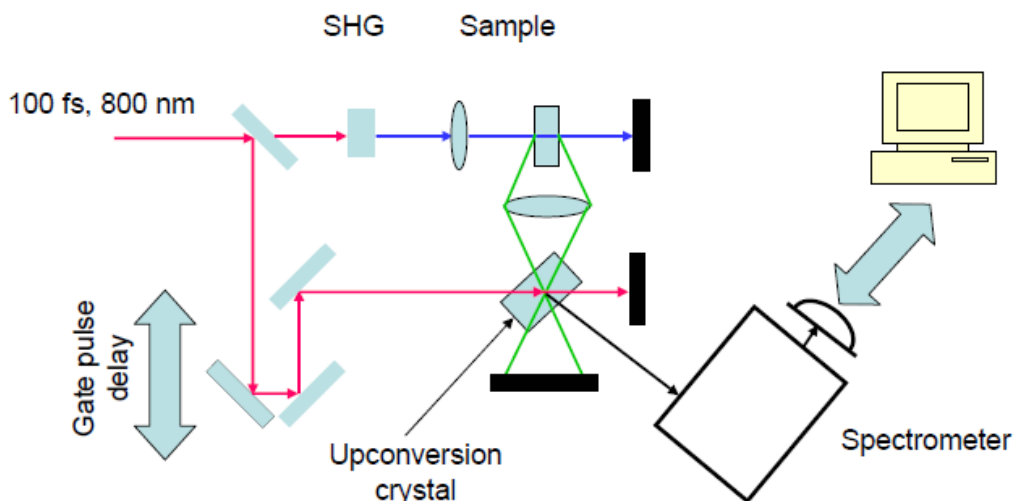


Рис. 15. Схема "up-conversion" спектрометра. [23]

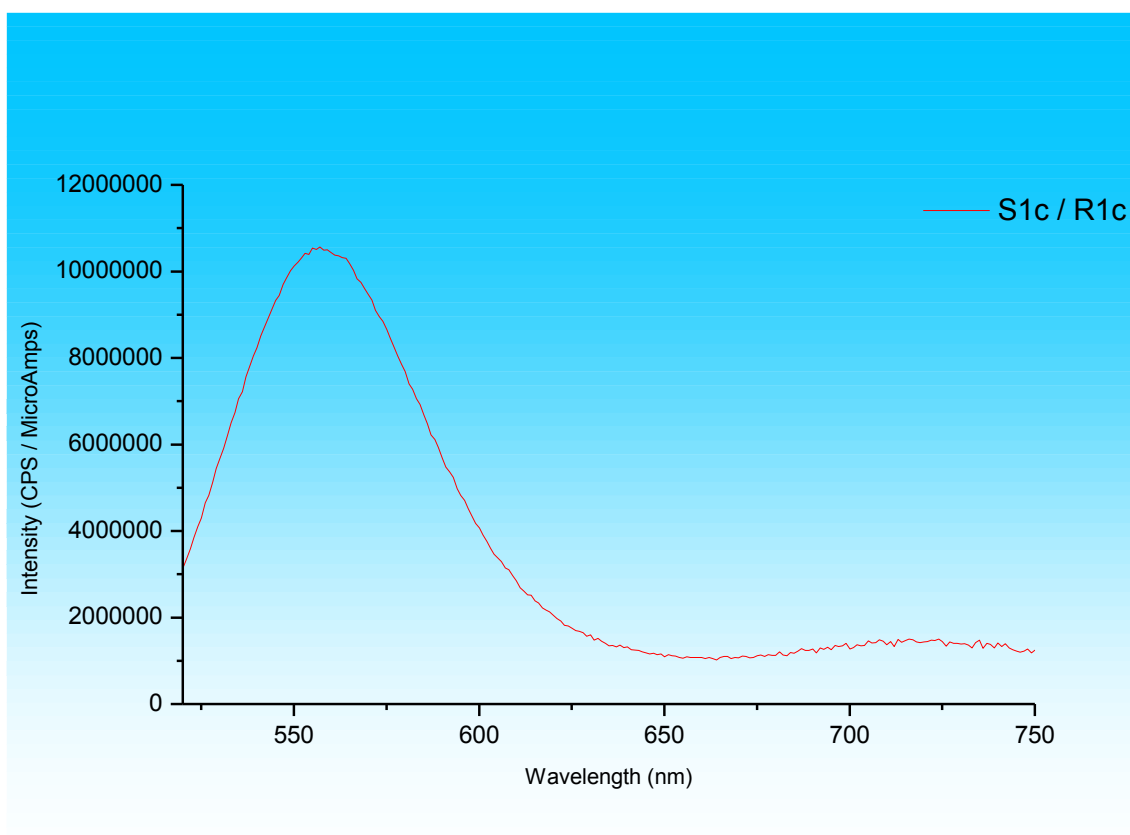
Ап-конверсия происходит, когда опорный импульс совпадает во времени с сигналом люминесценции. Величина сигнала суммарного импульса пропорциональна интенсивности люминесценции в момент времени, равный времени задержки между возбуждающим и опорным импульсом. Численно величина импульса ап-конверсии на порядки выше суммы величин опорного импульса и импульса люминесценции. Временное разрешение определяется длительностью лазерного импульса и дисперсией групповой скорости в нелинейном кристалле.

## Результаты и обсуждение

### *Получение спектров возбуждения и испускания статической люминесценции*

Для оценки, того на каких длинах волн образец проявляет наиболее характерные фотофизические свойства, были получены спектры статической люминесценции.

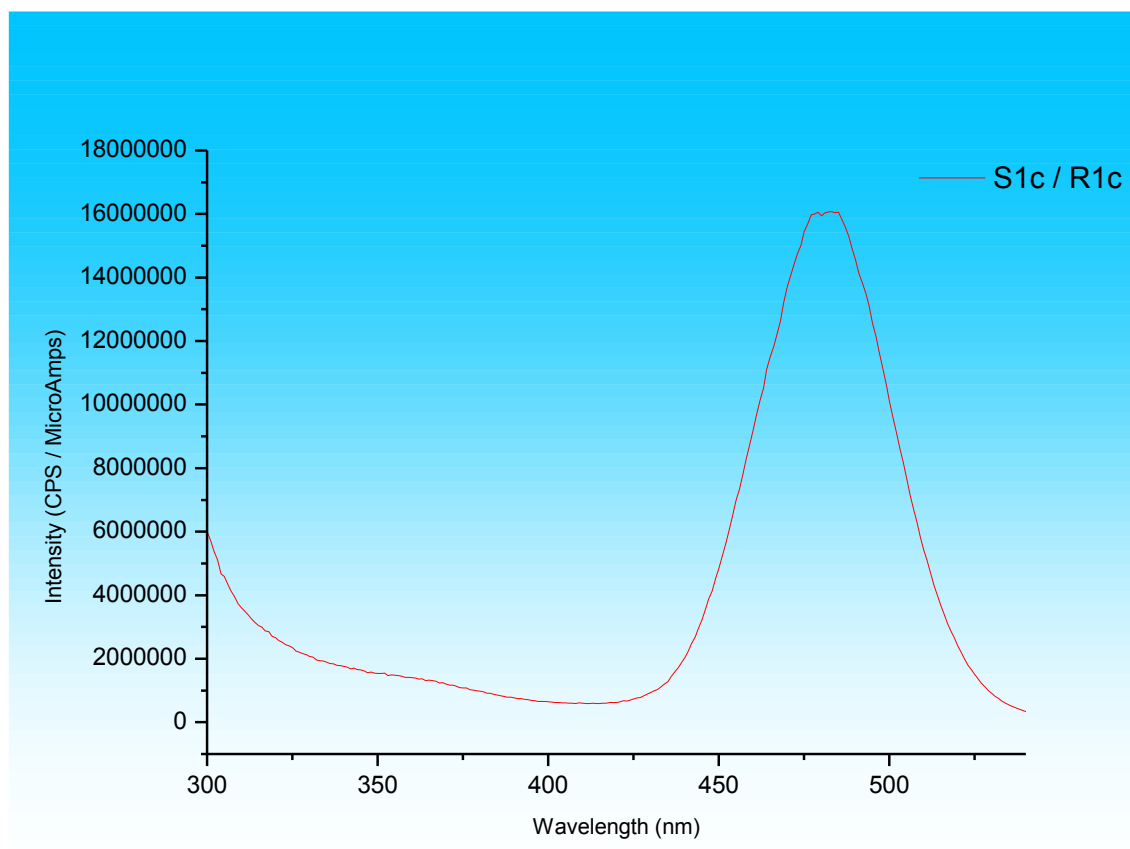
На длине волны возбуждения  $\lambda=500$  нм был получен спектр люминесценции (рис. 16):



**Рис. 16. Спектр испускания люминесценции при  $\lambda_{ex}=500$  нм.**

Как видно из спектра, максимум люминесценции достигается при длине волны люминесценции  $\lambda_{em}=550$  нм – 560 нм.

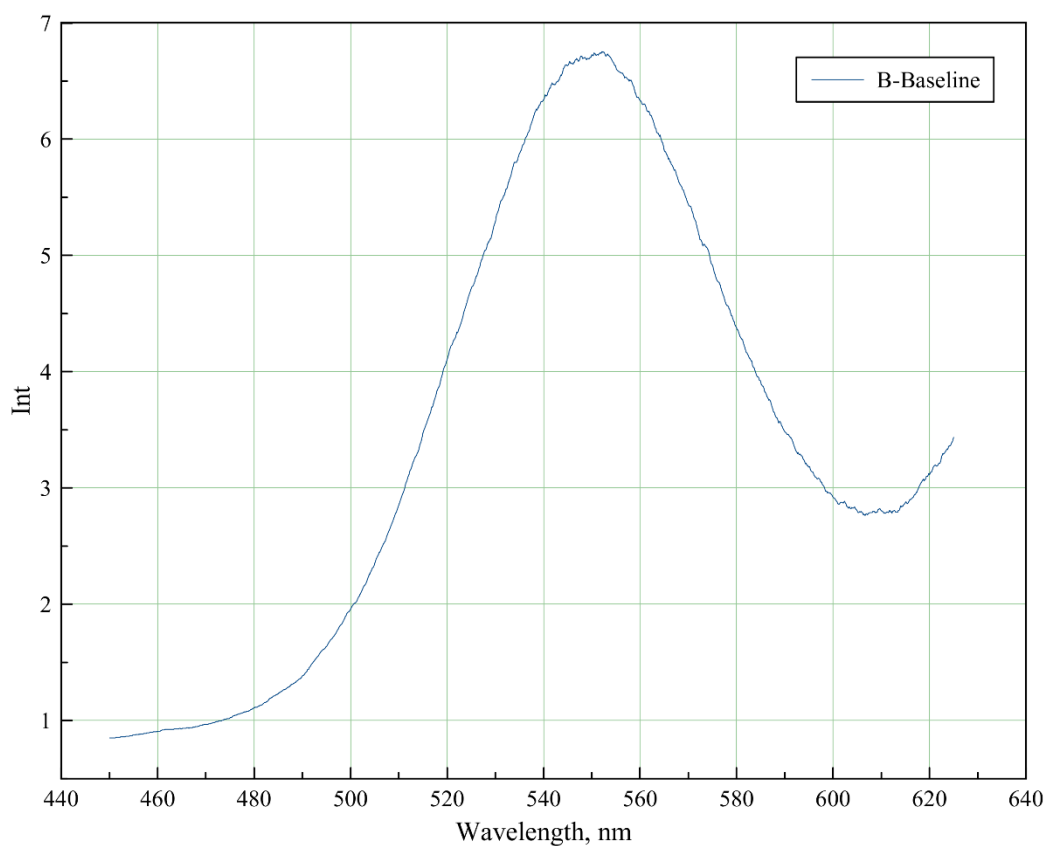
Исходя из этого, был получен спектр возбуждения (рис. 17):



**Рис. 17. Спектр возбуждения люминесценции при  $\lambda_{em}=560$  нм.**

Как видно из спектра, максимум полосы возбуждения люминесценции кластера составляет около 480 нм.

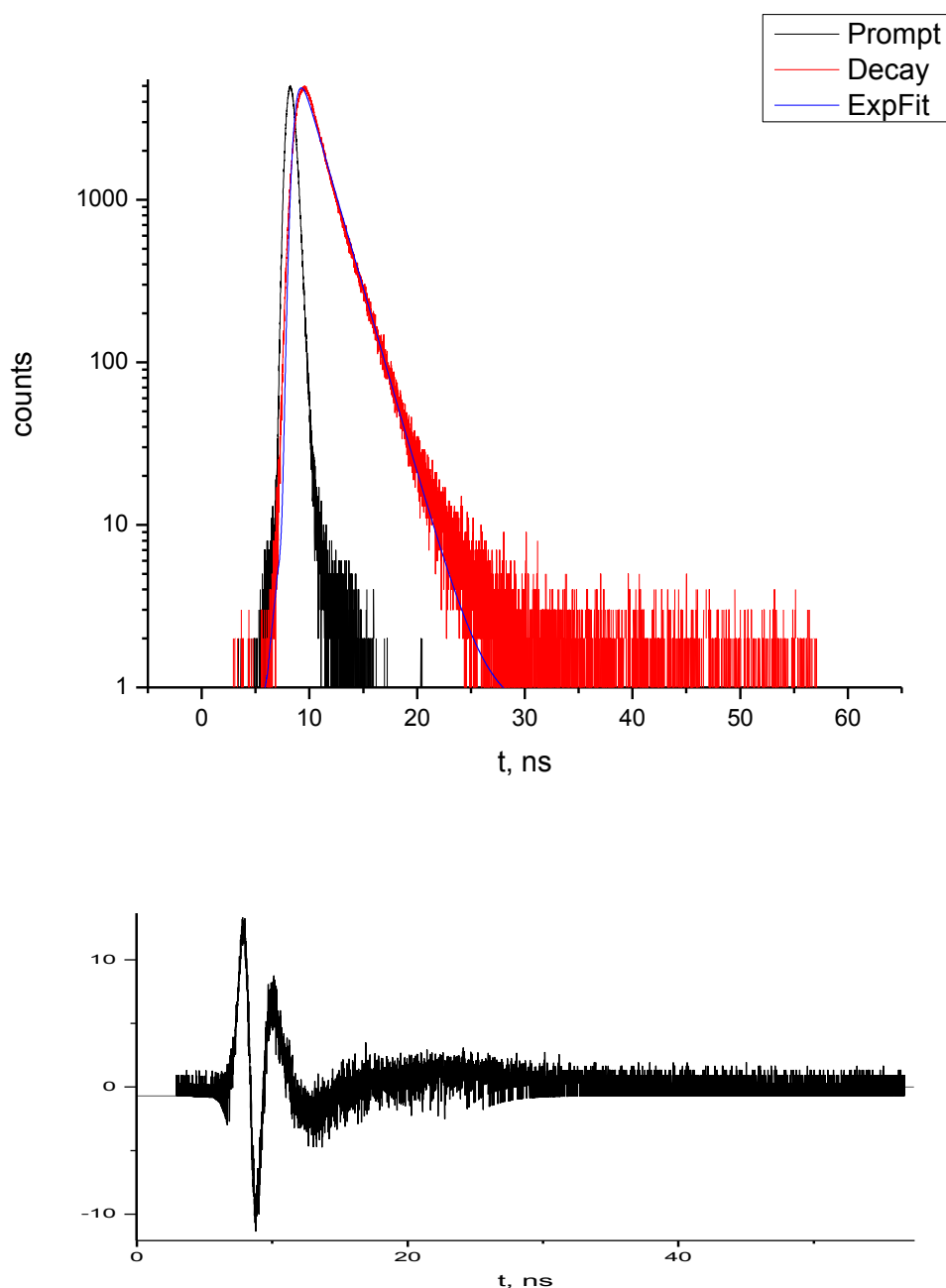
Также был получен спектр люминесценции при возбуждении на длине волны 400нм, используемой при регистрации временных спектров (рис. 18). При этом, помимо кластера с максимумом 550 нм, в красной области спектра наблюдается люминесценция еще одного кластера.



**Рис. 18. Спектр испускания люминесценции при  $\lambda_{ex}=400$  нм.**

### ***Измерение времени жизни люминесценции кластеров в наносекундном диапазоне***

Для определения времени жизни кластера, люминесцирующего на длине волны 560 нм, была получена кривая затухания люминесценции (рис. 19) при возбуждении кластера светодиодом (с длительностью импульса 1,1 нс) на длине волны  $\lambda_{ex}=495$  нм. Люминесценция измерялась на длине волны  $\lambda_{em}=560$  нм.



**Рис. 19.** Спектр затухания люминесценции на длине волны 560 нм ( $\lambda_{ex}=495$  нм) и соответствующий ему график ошибок.

Кривая достаточно хорошо аппроксимируется экспоненциальной зависимостью:

$$y = y_0 + A1 * e^{-t/t1} \quad (2)$$

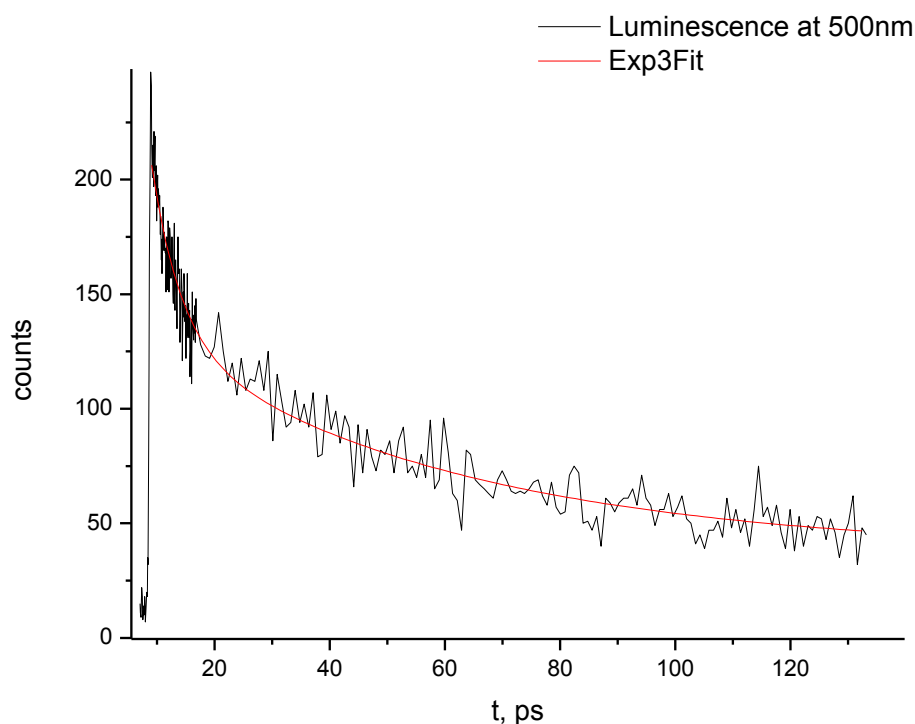
С коэффициентами  $y_0=0,7$ ,  $A1=0,01$ ,  $t_1=1,9$  нс. Таким образом, время жизни люминесцирующего кластера  $t_{\text{lightNC}}=1,9$  нс. С учетом ширины аппаратной функции (около 1 нс) погрешность определения времени жизни можно оценить как 0,2 нс.

### ***Измерение времени жизни люминесценции кластеров в пикосекундном диапазоне***

Были получены временные спектры затухания люминесценции при возбуждении образца фемптосекундными лазерными импульсами длиной волны 400 нм (вторая гармоника лазера) и длинах волн люминесценции: 500 нм, 510 нм, 520 нм, 530 нм, 540 нм, 550 нм, 560 нм, 570 нм, 580 нм. Все полученные спектры были аппроксимированы триэкспоненциальной зависимостью:

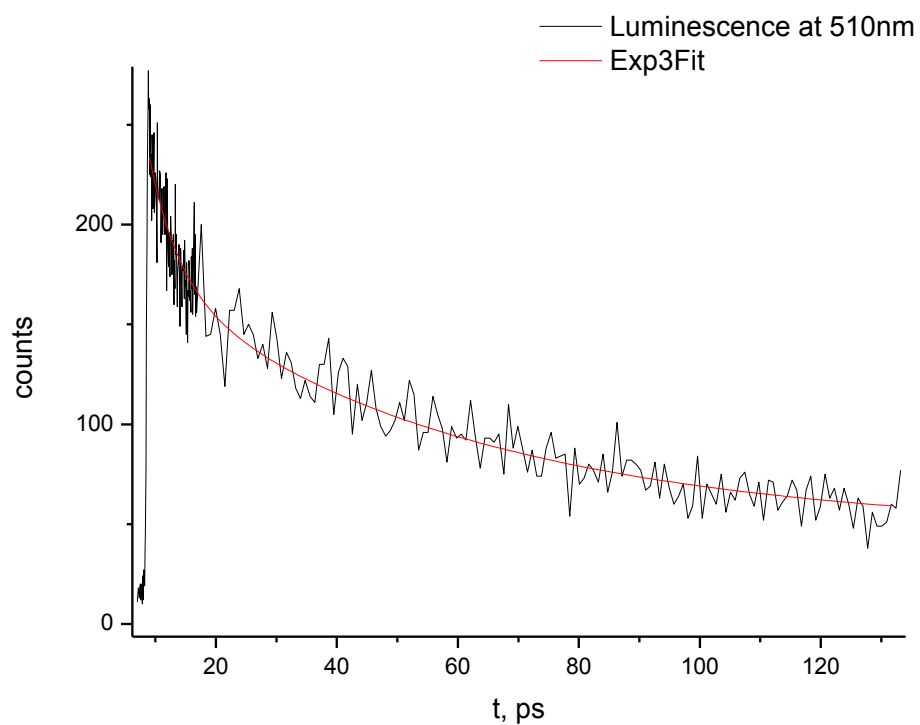
$$y = y_0 + A1 * e^{-t/t1} + A2 * e^{-t/t2} + A3 * e^{-t/t3} \quad (3)$$

Спектры с аппроксимациями представлены на рис. 20 – рис. 28.

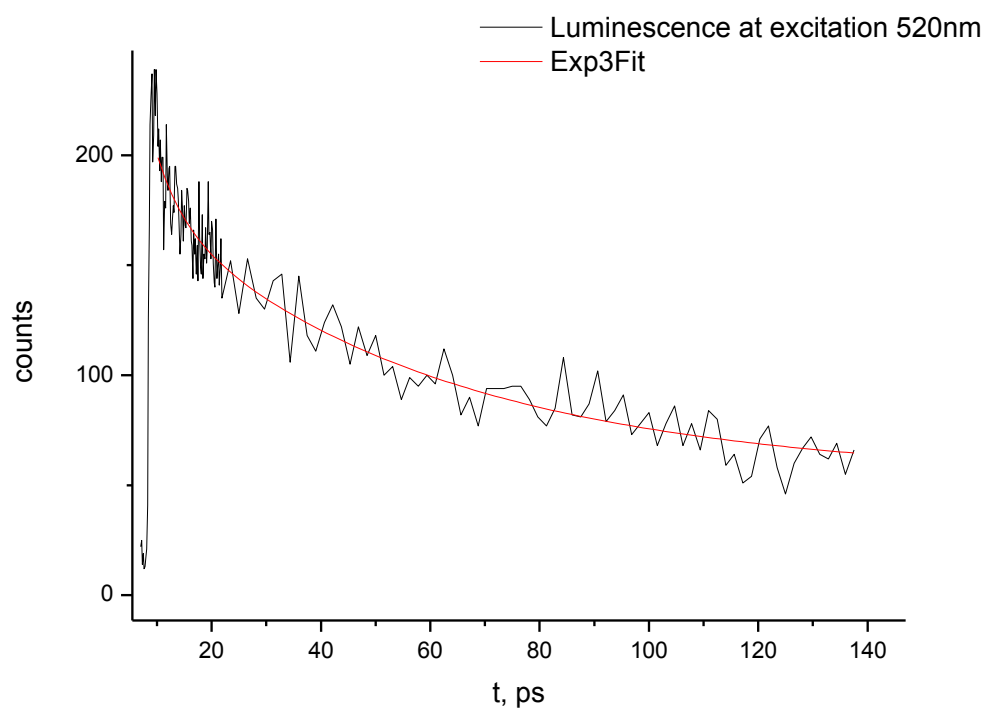


**Рис. 20. Спектр затухания люминесценции на длине волны 500 нм ( $\lambda_{ex}= 400\text{nm}$ ).**

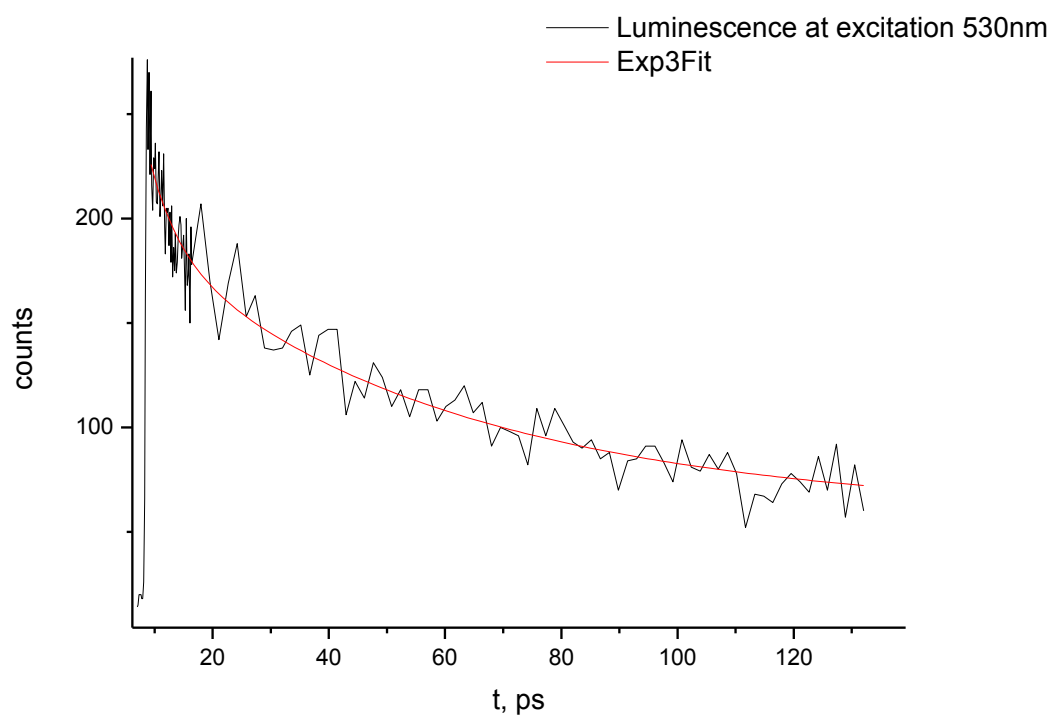




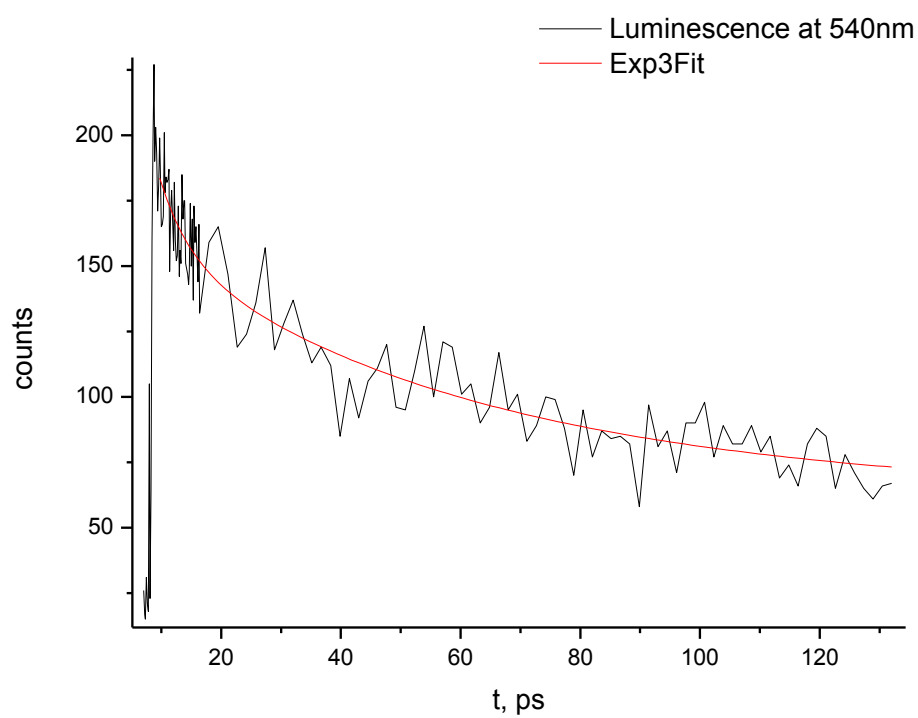
**Рис. 21. Спектр затухания люминесценции на длине волны 510 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



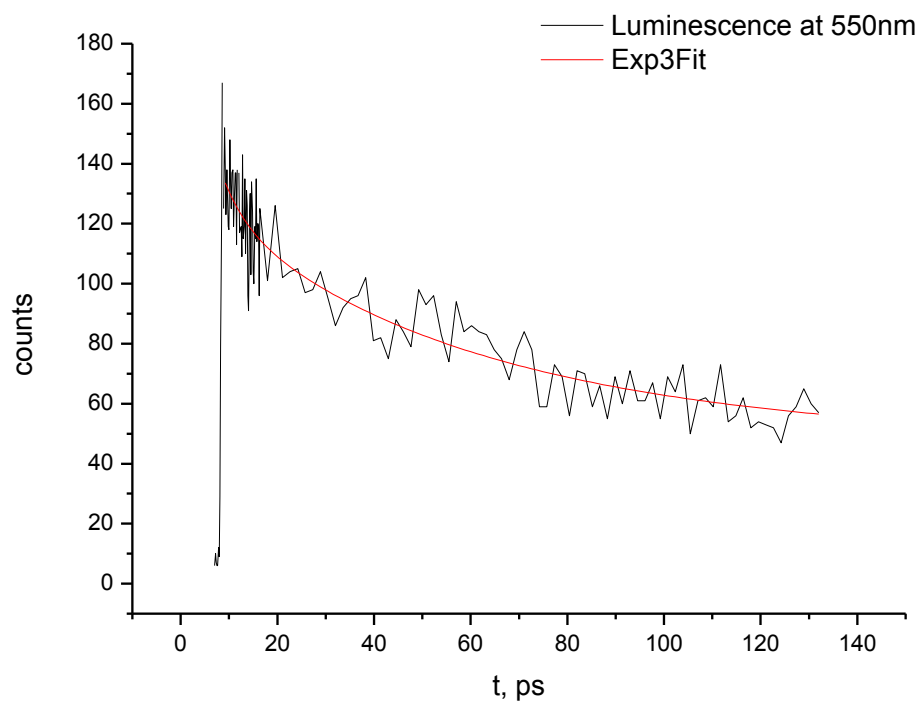
**Рис. 22. Спектр затухания люминесценции на длине волны 520 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



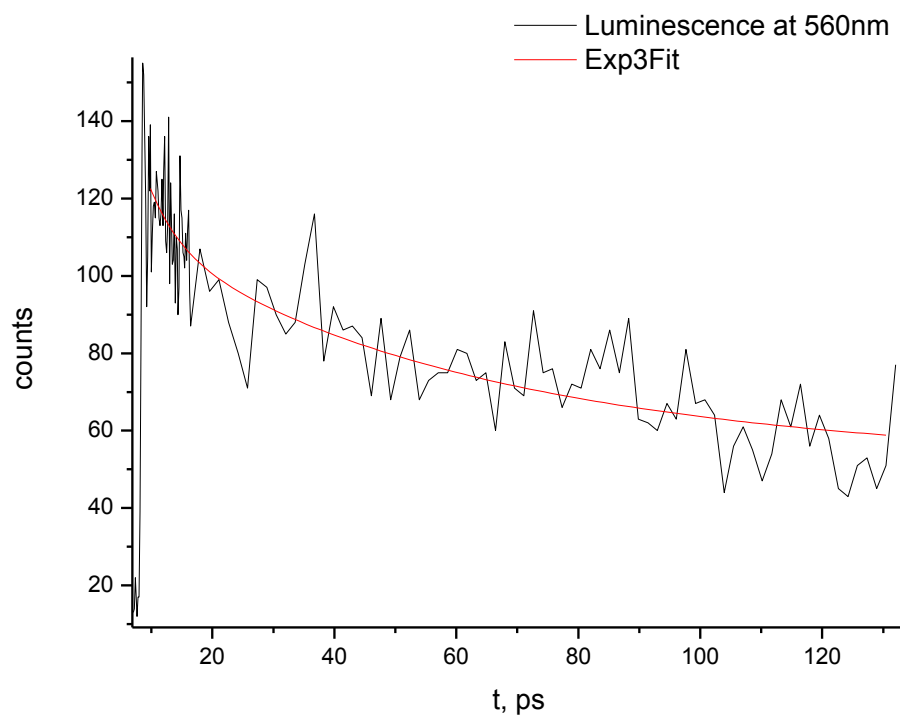
**Рис. 23. Спектр затухания люминесценции на длине волны 530 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



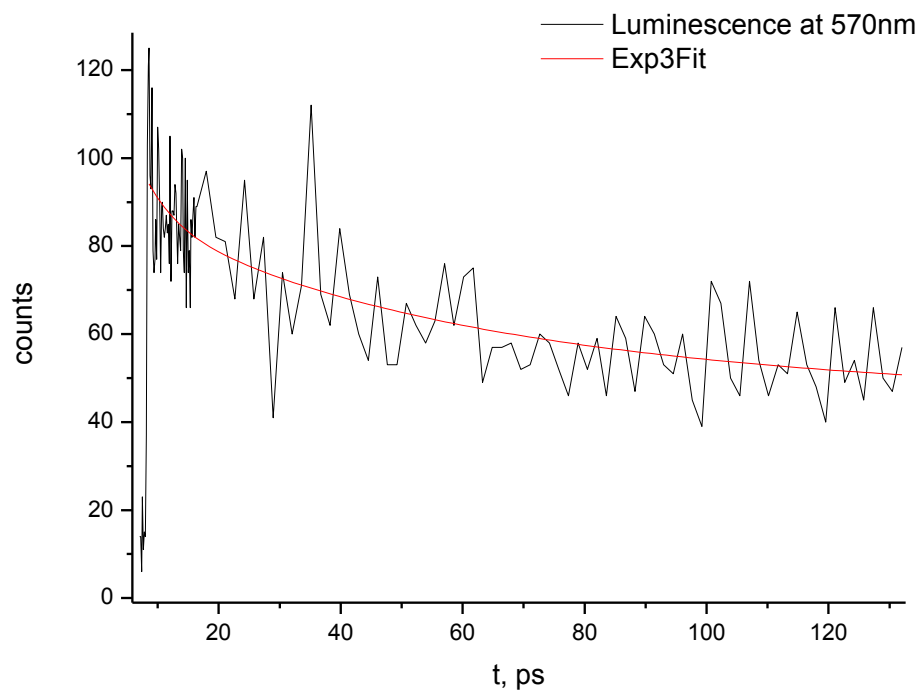
**Рис. 24. Спектр затухания люминесценции на длине волны 540 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



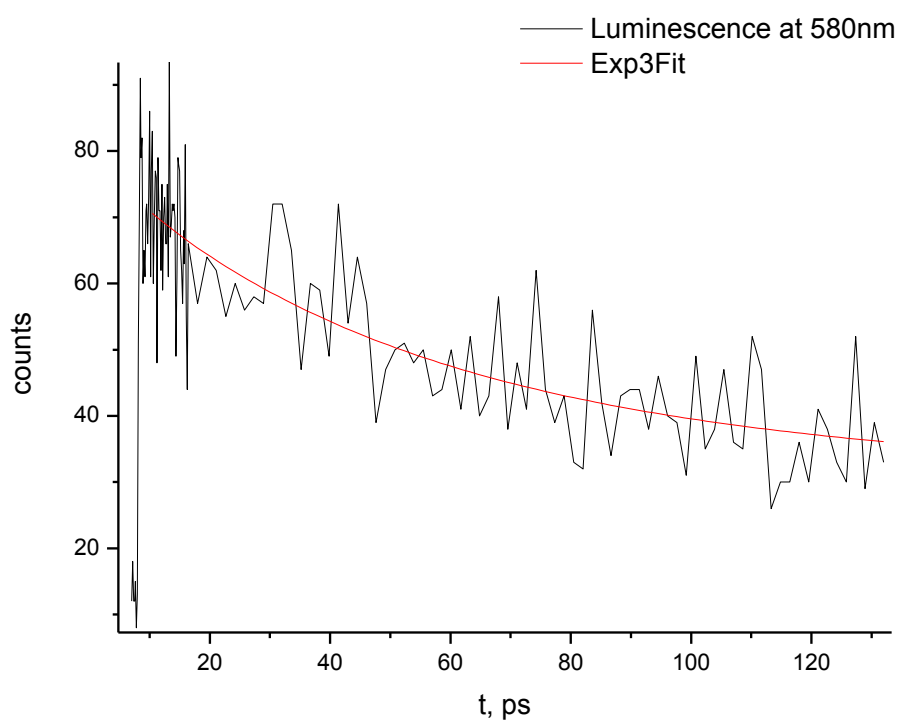
**Рис. 25. Спектр затухания люминесценции на длине волны 550 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



**Рис. 26. Спектр затухания люминесценции на длине волны 560 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



**Рис. 27. Спектр затухания люминесценции на длине волны 570 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**



**Рис. 28. Спектр затухания люминесценции на длине волны 580 нм ( $\lambda_{ex}=400$  нм).**

Изначально, аппроксимация графиков (рис. 20 – рис. 28) проводилась без фиксации времен  $t_1$  и  $t_2$  и с фиксацией  $y_0$  и  $t_3$ . В большинстве аппроксимаций графиков значения  $t_1$  и  $t_2$  колебались около значений 5 пс и 50 пс соответственно. Однако, некоторые аппроксимации графиков имели значения  $t_1$  и  $t_2$  значительно отличающиеся от значений приведенным выше, либо амплитуда принимала отрицательное значение. Данный факт можно объяснить высокими флуктуационными выбросами, присутствующими в этих спектрах и трудностью нахождения глобального минимума. Поэтому аппроксимация, представленная на рис. 20 – рис. 28 проводилась с фиксированными  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $y_0$ .

Коэффициент  $y_0$  фиксировался как значение средней флуктуации, а времена  $t_1$ ,  $t_2$  и  $t_3$  фиксировались как значения 5 пс, 50 пс и 1000 пс соответственно.

Из полученных аппроксимаций были взяты коэффициенты  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ .

$\lambda$ , нм	$A_1$	$A_2$	$A_3$
500	462	106	29
510	379	141	37
520	210	135	42
530	266	141	54
540	199	101	53
550	84	77	49
560	103	56	42
570	52	39	36
580	3	42	27

**Табл. 2. Коэффициенты  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  в зависимости от длины волны люминесценции.**

Получено 3 графика зависимости (рис. 29 – рис. 31).

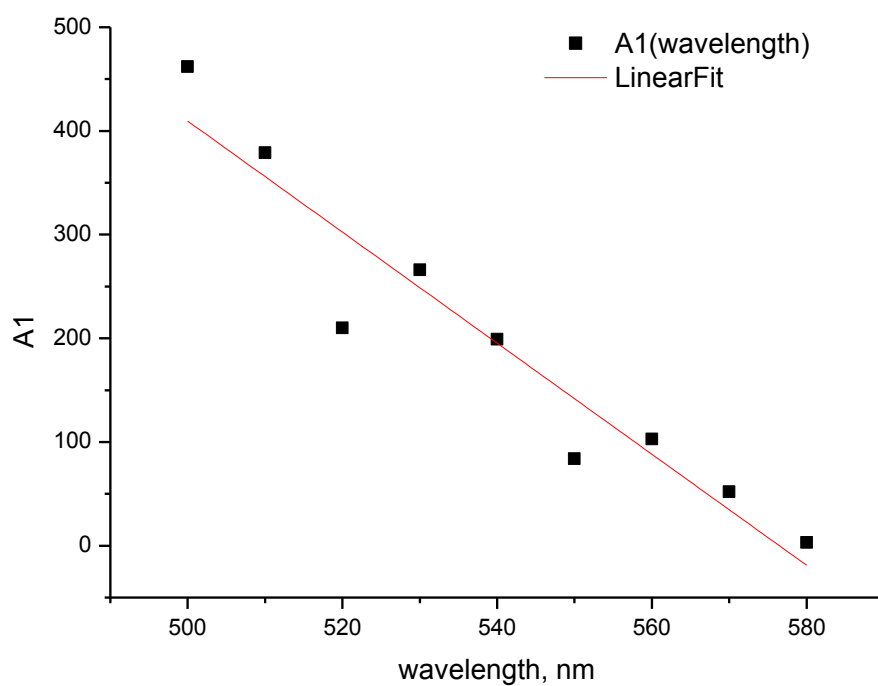


Рис. 29. График зависимости коэффициента A1 от длины волны люминесценции.

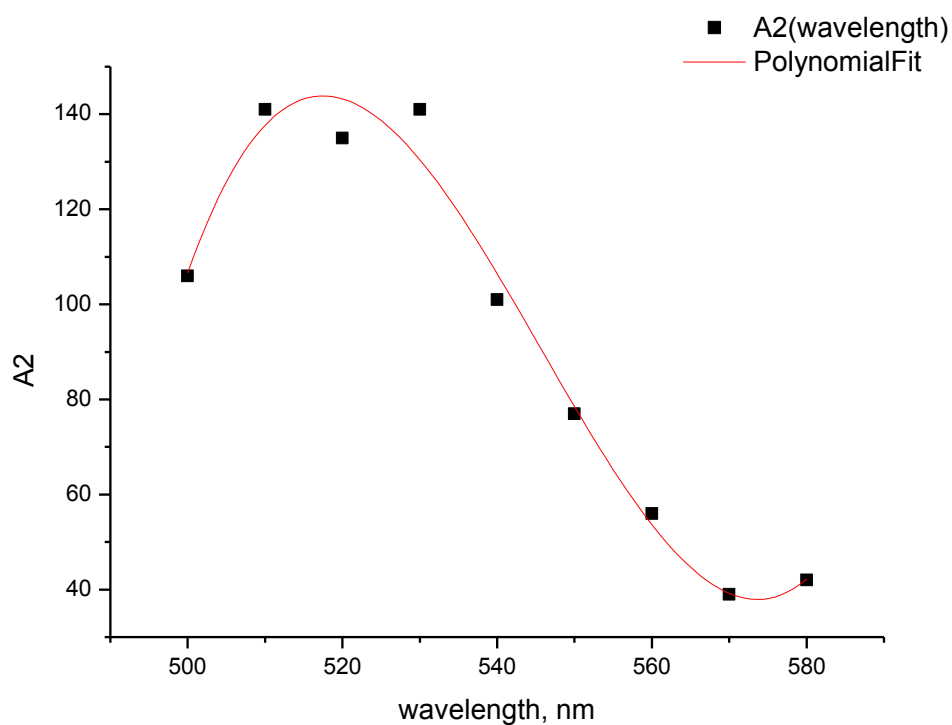
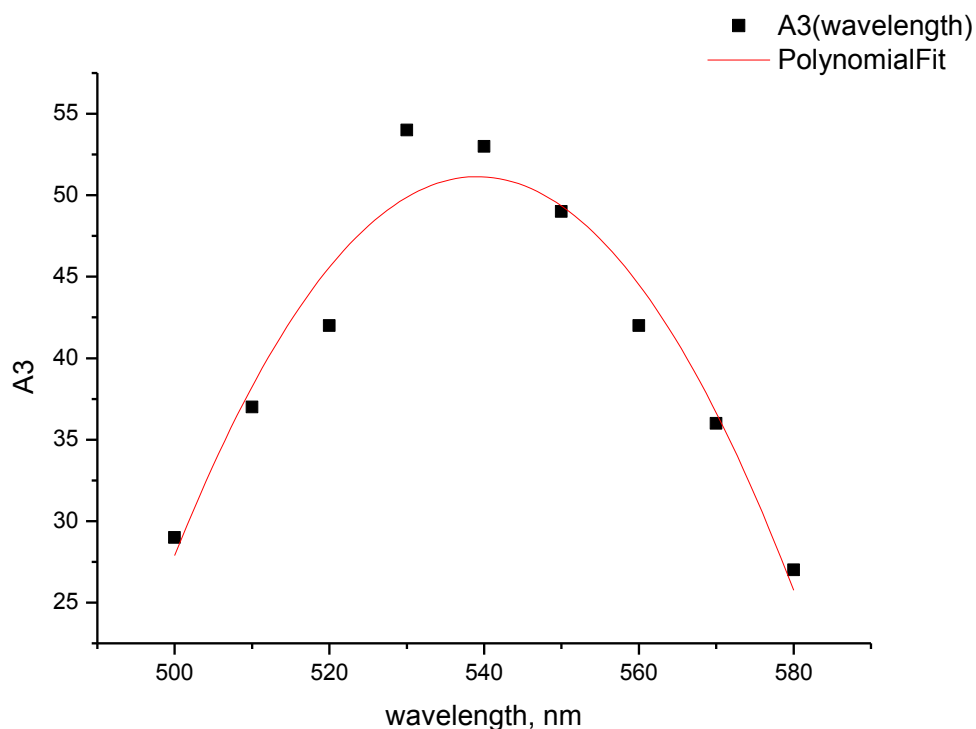


Рис. 30. График зависимости коэффициента A2 от длины волны люминесценции.



**Рис. 31. График зависимости коэффициента  $A_3$  от длины волны люминесценции.**

Анализируя поведение графика  $A_1(\lambda)$  – линейный спад значений при увеличении длины волны люминесценции, можно сделать вывод, что данный процесс соответствует процессу релаксации растворителя и/или всего комплекса в целом. Значение времени релаксации приблизительно равно  $t_1=5$  пс.

Из двух других графиков (рис. 28 – рис. 29) и спектров затухания (рис. 20 – рис. 28) следует, что при временах больших 5 пс процессы перехода вещества из возбужденного состояние в основное, обусловлены люминесценцией двух типов кластеров.

На длинах волн люминесценции 510 нм - 530 нм проявляется темновой кластер, который практически не вносит вклад в статическую люминесценцию. Время жизни данного кластера составляет около  $t_{\text{darkNC}}=50$  пс.

Долгоживущая компонента с максимумом около 540 нм очевидно относится к люминесцирующему кластеру, проявляющемуся в стационарном спектре и имеющий в стационарном спектре максимум люминесценции 555 нм. Отметим, что время жизни люминесценции данного кластера из пикосекундных спектров определить нельзя, т.к. его время жизни имеет наносекундный порядок. Поэтому его время жизни было определено выше как 1,9 нс.

Время жизни люминесценции пропорционально квантовому выходу. Поэтому квантовый выход темнового кластера с максимумом флуоресценции около 520 нм должен быть приблизительно в 40 раз меньше, чем квантовый выход люминесцирующего кластера. Известно, что квантовый выход флуоресцирующих кластеров серебра составляет обычно десятки процентов, а время жизни порядка нескольких наносекунд.



## Заключение

В рамках данной работы проведено исследование динамики электронно-возбужденных состояний для системы Green2 состоящей из кластера серебра и 15- мерного олигонуклеотида.

Были получены спектры возбуждения и испускания статической люминесценции данной системы.

Была получена кривая затухания люминесценции в наносекундном диапазоне при возбуждении системы на длине волны 495 нм. Показано, что данная кривая может быть аппроксимирована экспонентой и получено значение времени жизни люминесцирующего кластера.

Проведен анализ кинетики затухания флуоресценции на пикосекундной временной шкале в широком спектральном диапазоне. Получены спектры люминесценции для трех компонент при возбуждении системы на длине волны 400нм. Проведен анализ данных спектров, найдено значение времени релаксации системы и время безызлучательной дезактивации для темнового кластера, не проявляющегося в стационарных спектрах.

Таким образом, в результате экспериментов, удалось установить присутствие в комплексе DNA-AgNC двух кластеров:

- 1) Темновой кластер с максимумом испускания люминесценции около 520 нм и с временем жизни 50 пс.*
- 2) Флуоресцирующий кластер с максимумом испускания люминесценции около 560 нм и временем жизни 1,9 нс.*

## **Благодарности**

Хочется выразить благодарность Ресурсному Центру СПбГУ "Физические методы исследования поверхности", а также лично специалисту Сердобинцеву Павлу Юрьевичу.

Выражаю благодарность Ресурсному Центру СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества" ([laser.spbu.ru](http://laser.spbu.ru)), а также лично специалисту по спектрофлуорометрии Колесникову Илье Евгеньевичу.

Выражаю благодарность сотруднику нашей лаборатории Ревегуку Захару Вячеславовичу за помощь в постановке эксперимента.

Выражаю особую благодарность моему научному руководителю, кандидату физико-математических наук, доценту кафедры Молекулярной биофизики и физики полимеров СПбГУ, Кононову Алексею Игоревичу.

## Список литературы

- 1) Li, Jingjing; Zhu, Jun-Jie; Xu, Kai, Fluorescent metal nanoclusters: From synthesis to applications, TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, Том: 58 Специальный выпуск: SI Стр.: 90-98 Опубликовано: JUN 2014
- 2) Автор: Petty, JT; Zheng, J; Hud, NV; и др., DNA-Templated Ag Nanocluster Formation, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Том: 126 Выпуск: 16 Стр.: 5207-5212 Опубликовано: APR 28 2004
- 3) Richards, Chris I.; Choi, Sungmoon; Hsiang, Jung-Cheng; и др. Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Том: 130 Выпуск: 15 Стр.: 5038-+ Опубликовано: APR 16 2008
- 4) Автор: Yu, Junhua; Patel, Sandeep A.; Dickson, Robert M., In Vitro and Intracellular Production of Peptide-Encapsulated Fluorescent Silver Nanoclusters, ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION Том: 46 Выпуск: 12 Стр.: 2028-2030 Опубликовано: 2007
- 5) Ramazanov, Ruslan R.; Kononov, Alexei I., Excitation Spectra Argue for Threadlike Shape of DNA-Stabilized Silver Fluorescent Clusters, JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C Том: 117 Выпуск: 36 Стр.: 18681-18687 Опубликовано: SEP 12 2013
- 6) Автор: Schultz, Danielle; Copp, Stacy M.; Markesevic, Nemanja; и др., Dual-Color Nanoscale Assemblies of Structurally Stable, Few-Atom Silver Clusters, As Reported by Fluorescence Resonance Energy Transfer, ACS NANO Том: 7 Выпуск: 11 Стр.: 9798-9807 Опубликовано: NOV 2013
- 7) Volkov, Ivan L.; Ramazanov, Ruslan R.; Ubyivovk, Evgeniy V.; и др., Fluorescent Silver Nanoclusters in Condensed DNA, CHEMPHYSICHEM Том: 14 Выпуск: 15 Стр.: 3543-3550 Опубликовано: OCT 21 2013
- 8) Liu, Guiying; Shao, Yong; Ma, Kun; и др., Synthesis of DNA-templated fluorescent gold nanoclusters, GOLD BULLETIN Том: 45 Выпуск: 2 Стр.: 69-74 Опубликовано: 2012
- 9) Liu, Guiying; Shao, Yong; Peng, Jian; и др., Highly thymine-dependent formation of fluorescent copper nanoparticle templated by ss-DNA, NANOTECHNOLOGY Том: 24 Выпуск: 34 Номер статьи: 345502 Опубликовано: AUG 30 2013
- 10) Rotaru, Alexandru; Dutta, Subrata; Jentzsch, Elmar; и др., Selective dsDNA Templated Formation of Copper Nanoparticles in Solution, ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION Том: 49 Выпуск: 33 Стр.: 5665-5667 Опубликовано: 2010
- 11) Xie, Jianping; Zheng, Yuangang; Ying, Jackie Y., Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY Том: 131 Выпуск: 3 Стр.: 888-+ Опубликовано: JAN 28 2009
- 12) Kawasaki, Hideya; Hamaguchi, Kenji; Osaka, Issey; и др., pH-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue Green and Red Fluorescent Emission,

- ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS Том: 21 Выпуск: 18 Стр.: 3508-3515 Опубликовано: SEP 23 2011
- 13) Li, Min; Yang, Da-Peng; Wang, Xiansong; и др., Mixed protein-templated luminescent metal clusters (Au and Pt) for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing, NANOSCALE RESEARCH LETTERS Том: 8 Стр.: 1-5 Номер статьи: 182 Опубликовано: APR 19 2013
  - 14) Zhao, MQ; Sun, L; Crooks, RM, Preparation of Cu Nanoclusters within Dendrimer Templates, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY Том: 120 Выпуск: 19 Стр.: 4877-4878 Опубликовано: MAY 20 1998
  - 15) Jie Zheng, Jeffrey T. Petty, and Robert M. Dickson, High Quantum Yield Blue Emission from Water-Soluble Au<sub>8</sub> Nanodots, J. AM. CHEM. SOC. 9 VOL. 125, NO. 26 Стр: 7780-7781 Опубликовано: APR 4 2003
  - 16) Shin-ichi Tanaka, Koichi Aoki, Atsushi Muratsugu, Hidekazu Ishitobi, Takashi Jin, and Yasushi Inouye, Synthesis of green-emitting Pt<sub>8</sub> nanoclusters for biomedical imaging by pre-equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) and mild reduction, OPTICAL MATERIALS EXPRESS Vol. 3, No. 2 Стр: 157-165 Опубликовано: JAN 3 2013
  - 17) Esumi, K; Miyamoto, K; Yoshimura, T, Comparison of PAMAM–Au and PPI–Au Nanocomposites and Their Catalytic Activity for Reduction of 4-Nitrophenol, JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE Том: 254 Выпуск: 2 Стр.: 402-405 Опубликовано: OCT 15 2002
  - 18) Alexei I. Kononov, Ivan L. Volkov, Zakhar V. Reveguk, Pavel Yu. Serdobintsev, Ruslan R. Ramazanov, DNA as UV Light Harvesting Antenna (в публикации)
  - 19) Patel, Sandeep A.; Cozzuol, Matteo; Hales, Joel M.; и др., Electron transfer-induced blinking in Ag nanodot fluorescence, JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C Том: 113 Выпуск: 47 Стр.: 20264-20270 Опубликовано: NOV 26 2009
  - 20) Polymers and Light. Fundamentals and Technical Applications. W. Schnabel, 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
  - 21) Hung-Chi Hsu, Yang-Xiu Lin, and Chih-Wei Chang, The Spectral Relaxation and Fluorescence Anisotropy Decay Dynamics of the Silver Nanoclusters Labeled on the Human Telomeric DNA, New J. Chem., 2015,39, Стр: 2140-2145
  - 22) BERTHOD, A; LASERNA, JJ; WINEFORDNER, JD, Surface Enhanced Raman Spectrometry on Silver Hydrosols Studied by Flow Injection Analysis, APPLIED SPECTROSCOPY Том: 41 Выпуск: 7 Стр.: 1137-1141 Опубликовано: SEP-OCT 1987
  - 23) Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Bernard Valeur, 2001 Wiley-VCH Verlag GmbH